

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE DOS MICROALGAS MARINAS UTILIZADAS COMO ALIMENTO EN MARICULTURA

R.O. CAÑIZARES, G. MOLINA y A.R. DOMÍNGUEZ

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
Apartado Postal 14-740. 07300 México, D.F.

RESUMEN - En el presente trabajo se determinó la composición química de las microalgas *Isochrysis* sp. (Chrysophyta) y *Tetraselmis chui* (Chlorophyta) cultivadas bajo condiciones controladas de laboratorio, utilizando agua de mar natural enriquecida de acuerdo con las formulaciones de Miquel-Matue y f/2 de Guillard.

En análisis químico de sus biomásas, reveló que el principal constituyente orgánico fueron los carbohidratos para ambas algas, independientemente del medio de cultivo utilizado, siendo la ramosa y xilosa los azúcares predominantes. El contenido de proteínas de ambas algas, se vio influido por la formulación del medio de cultivo y estuvo caracterizado principalmente por los aminoácidos alanina, leucina y por los ácidos glutámico y aspártico. Los lípidos variaron de acuerdo con la composición del medio de cultivo, siendo mayor su concentración cuando se utilizó la formulación del Miquel-Marue. El principal ácido de 18 carbonos, presente en la biomasa de ambas algas fue el ácido oleico, seguido de linoleico y linolénico.

ABSTRACT - The chemical composition of *Isochrysis* sp. (Chrysophyta) and *Tetraselmis chui* (Chlorophyta) grown in two types of enriched seawater media (Miquel-Matue and f/2 Guillard) under controlled conditions, was determined.

The chemical analysis of the biomass revealed that carbohydrates were the main constituents in both algae, and that these was not affected by the formulation of the culture media. The predominant sugars were xylose and rhamnose. Protein and lipid content in the biomass varied according to the formulation used. Algal proteins were mainly characterized by alanine, leucine, glutamic and aspartic acids. In relation to lipids, oleic acid was the main constituent followed by linoleic and linolenic acids.

RÉSUMÉ - La composition chimique de *Isochrysis* sp. (Chrysophyta) et de *Tetraselmis chui* (Chlorophyta), cultivés en conditions contrôlées dans l'eau de mer enrichie (milieu de Miquel-Matue, et f/2 de Guillard), a été déterminée.

Pour les deux microalgues, l'analyse quantitative de biomasse montre que les principaux composants sont les carbohydrides indépendamment du milieu employé. Par contre le taux des acides aminés (essentiellement alanine, leucine, acides glutamique et aspartique) diffère selon le milieu utilisé. La concentration la plus élevée en lipides a été obtenue avec le milieu de Miquel-Marue. Pour les deux microalgues, l'acide oléique est le principal constituant.

KEY WORDS - Microalgae, *Isochrysis* sp., chemical composition, culture.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de las algas verdes se ha estudiado desde principios de siglo en investigaciones fundamentales de fisiología y bioquímica vegetal (Bold, 1942), pero

fue en las décadas de los años 30 y 40, cuando se concibió la idea de que las algas microscópicas podían cultivarse masivamente para ser utilizadas como fuente de alimento, siempre y cuando se observaran las condiciones óptimas de cultivo. Estas técnicas se han difundido considerablemente en los últimos 20 años, haciendo del estudio del fitoplancton en ambientes controlados, un método útil en diversas investigaciones (Richmond, 1980; Sakshaug, 1980).

El enfoque que actualmente recibe atención por parte de muchos investigadores en diferentes partes del mundo, es la utilización de las algas planctónicas como alimento en el cultivo de organismos marinos comerciales, larvas o adultos, principalmente filtradores que actualmente son de importancia en maricultura. Las algas también se utilizan para el cultivo masivo de zooplancton (rotíferos, copépodos y artemia salina) en donde su valor en esta cadena alimentaria es crítico ya que los nutrientes esenciales contenidos en las microalgas pasan vía el cultivo intermediario de zooplancton a los organismos bajo cultivo. El valor nutricional de las microalgas depende principalmente de su composición química y de los requerimientos nutricionales específicos de los animales que serán alimentados con ellas.

Existen estudios que demuestran que dietas elaboradas con especies seleccionadas de microalgas, pueden favorecer el crecimiento y desarrollo normal de formas juveniles de moluscos bivalvos y que cuando se alimentan estos organismos con dietas que no contienen microalgas, los resultados que se obtienen son poco relevantes (Loosanof & Davis, 1963; Flaak & Epifanio, 1978; Enright *et al.*, 1986; Hotsman, 1985).

Se han utilizado diferentes especies de microalgas como alimento vivo para invertebrados y vertebrados acuáticos. Así por ejemplo se ha demostrado que *Isochrysis galbana* favorece el crecimiento de larvas de bivalvos. *Chlorella* es más conveniente para el cultivo de *Brachionus*, pero no para ostión ni camarón (Epifanio, 1979a, 1979b). Recientemente, se sugirió que la concentración de aminoácidos y su composición en la biomasa de microalgas tiene un papel importante en el crecimiento y desarrollo de moluscos bivalvos (De Pauw, 1981; Aldana, 1986). Lo mismo se puede decir sobre los lípidos, cuya calidad importa más que su cantidad.

Las variaciones en el crecimiento y la composición química de las células de microalgas dependen de numerosos factores, entre los que se encuentran la luz, salinidad, pH, temperatura y concentración de nutrientes, mismos que guardan relación con las condiciones de cultivo.

Debido a la amplia variedad de aplicaciones que tienen los sistemas de algas, existe una gran cantidad de medios de cultivo, y modificaciones de ellos reportados en la literatura (Nichols, 1973). Por lo que antes de elegir uno de ellos, es importante tomar en cuenta la proporción de N:P, el pH, los macro y micronutrientes además del conocimiento básico de la fisiología y nutrición del organismo bajo cultivo. Entre los medios de uso generalizado que cumplen con estas características encontramos al medio f/2 de Guillard (Guillard & Ryther, 1962) entre otros y el de Miquel-Matue (Alfonso & Leal, 1981), no tan utilizado como el anterior, pero que permite el crecimiento de ciertas algas en forma específica.

Algunos estudios sobre los diferentes factores que afectan el crecimiento de cultivos de *Isochrysis* y de *Tetraselmis* son los de Walne (1970) que analizó la relación N:P de *Tetraselmis chui* y *T. suecica*; Ukeles (1961) que estableció los intervalos de temperatura para el crecimiento de *Isochrysis galbana* y *Platymonas* sp.; Kain & Fogg (1958) quienes trabajaron sobre el pH y la saturación de luz para *I. galbana*; Laing &

Utting (1980) quienes estudiaron la influencia de la salinidad sobre *I. galbana* y *T. suecica* y Laing & Helm (1981) sobre los factores que afectan la producción de *T. suecica* (Kylin) Butch en recipientes de 200 l. Estos trabajos se vieron complementados por Fábregas *et al.* (1984, 1985) quienes analizaron la respuesta de cultivos estáticos de *I. galbana* y *T. suecica* a diferentes salinidades y concentración de nutrimentos. Uno de los primeros trabajos sobre composición química de biomasa de microalgas en función de las condiciones de cultivo y su relación con el medio ambiente, fue llevado a cabo por Spoehr & Milner (1949) con *Chlorella pyrenoidosa*, quienes encontraron que células desarrolladas en condiciones de limitación de nitrógeno, contienen aproximadamente 86 % del peso celular seco como lípidos, comparadas con células normales que tienen 4.5 %. Parsons *et al.* (1961) cultivaron y determinaron la composición química de once microalgas marinas de diversas clases, durante su fase exponencial de crecimiento y reportaron un contenido de proteínas en el rango de 17.6% a 57% en base seca, carbohidratos de 4.1% a 37%, lípidos de 2.9 a 18% y cenizas de 7.6% a 57%. Fábregas & Herrero (1985) reportaron la concentración y composición de aminoácidos de cuatro especies de microalgas marinas, cuyo contenido de proteínas fluctuó entre 39.13% y 54.20% en base seca, mientras que el contenido de lisina disponible estuvo entre 3.67 y 4.52 g/100 g de proteína.

En la literatura se citan también algunos informes sobre la composición química de diatomeas (Myklestad, 1974).

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos. - Las cepas de *Isochrysis* sp. (clona CCMP, T-Iso o NEPCC 601) y *Tetraselmis chui* fueron proporcionadas por el laboratorio de microalgas del Departamento de Recursos del Mar, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Mérida, Yucatán México. Cultivos "Stock" de estos organismos fueron conservados en medio líquido f/2-Guillard (Guillard & Ryther, 1962), preparado con agua de mar natural. Se preparon dos series de estos cultivos los cuales se mantenían en anaqueles con iluminación horizontal (ca. 3500 luxes) proporcionada por dos tubos de luz fluorescente marca Solar de 30 watts y de 95 centímetros de longitud cada uno, a una temperatura de 20 a 22°C. Una vez que se observaba crecimiento en los tubos (después de 2 días), una serie se trasladaba a un cuarto frío (4°C) en oscuridad y la otra permanecía en el mismo anaquel iluminado, hasta su posterior resiembra (cada mes).

Agua de mar. - En todos los ensayos se utilizó agua de mar natural colectada en Puerto Progreso, Yucatán y enviada al laboratorio. Antes de su envío, el agua se hizo pasar primero por filtros de concha y arena y posteriormente por una batería de cartuchos Millipore, siendo de 0.45 micras el poro más pequeño; por último fue irradiada con luz UV y envasada en recipientes de plástico opaco desinfectados con cloro. Ya en el laboratorio fue almacenada en refrigeración (4°C) en ausencia de luz.

Medios de cultivo. - Se prepararon enriqueciendo agua de mar natural, según las formulaciones de Miguel-Matue citado por Alfonso & Leal (1981) (composición en la Tabla I) y el f/2-Guillard ya mencionado. El medio de cultivo Miquel-Matue no se utiliza estéril, solo se somete a ebullición, por lo que los garrafones para los experimentos de producción de biomasa, se esterilizaron vacíos en autoclave horizontal ■ 121°C durante 15 minutos. Una vez a temperatura ambiente ■ les adicionó el medio

de Miquel-Matue y se dejó reposar por 48 horas. El medio f/2-Guillard contenido en los garrafones se esterilizó en la misma autoclave y bajo las condiciones descritas. Las condiciones de cultivo de las microalgas fueron para *Isochrysis* sp.: medio de cultivo Miquel-Matue, pH inicial de 8.2, $27 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura y 32‰ de salinidad. Para *Tetraselmis chui* fueron las mismas condiciones anteriores pero a la salinidad de 30‰.

TABLA I
COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE MIQUEL-MATUE MODIFICADO
(Alfonso & Leal, 1981)

SUSTANCIA		
A	KNO_3	4.04 g en 100 g de agua destilada
B	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.40 g " " " " "
C	K_2SiO_3	0.80 g " " " " "
D	Agar-agar	1.0 g " " " " "
E	FeCl_3	0.315 (quelada con 0.436 g de EDTA- Na_2)

Estas soluciones son añadidas a un litro de agua de mar en las siguientes proporciones: 10 ml de A, B y D, 3 ml de C, 1 ml de E.

Hervir y dejar durante 48 horas antes de utilizar.

Nota: Tanto las vitaminas (en el caso de *Isochrysis*) como la solución E, se adicionaron en la misma concentración que para el medio f/2-Guillard.

Preparación de inóculos. - Se tomaron alícuotas de un mililitro de los cultivos "Stock" y se pasaron a tubos de vidrio Pyrex de 15 x 150 mm, con 10 ml del medio de cultivo bajo ensayo. Para los experimentos con *Isochrysis* sp., se hizo necesario añadir vitaminas al medio. La incubación se llevó a cabo en los anaqueles ya mencionados. Después de 72 horas, cuando los cultivos se encontraban en fase exponencial, se procedió a su propagación mediante pases sucesivos a matraces Erlenmeyer de mayor capacidad cada vez. Finalmente a partir de un matraz Erlenmeyer de 500 ml se tomó una alícuota de 70 ml y se inoculó un matraz Fernbach de 2.8 l de capacidad total con 700 ml de medio de cultivo. La incubación de los matraces se hizo a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con iluminación y aereación continuas. Estos cultivos sirvieron como inóculos para los experimentos de producción de biomasa.

Obtención de biomasa - Se llevó a cabo en garrafones de vidrio Pyrex de 20 litros de capacidad total con 7 litros de medio de cultivo y una relación de inóculo de 10% (v/v). Cada garrafón tiene un tapón de neopreno con cuatro orificios que permiten la introducción simultánea de cuatro tubos de vidrio, con las funciones de toma de muestra (y al mismo tiempo para efectuar la cosecha), difusor de aire, puerta de inoculación y venteo del sistema. Los garrafones se colocaron en una unidad de cultivo con un sistema de iluminación con apagadores independientes para 10 lámparas fluorescentes de 20 watts y 57 cm de longitud, dispuestas ocho de manera vertical a los lados de la unidad, con una separación de 15 cm entre sí y 10 cm distantes de los garrafones. Dos lámparas están colocadas horizontalmente con la misma separación entre sí pero 20 cm distantes de los garrafones. En la parte superior de la unidad se encuentra una conexión de cobre con dos llaves de paso para regular el aire que se introduce al cultivo. Los cultivos se mantuvieron con aereación (1.5 vvm para *Isochrysis* sp. y 1.0 vvm para *T. chui*) e iluminación continuas (ca. 3500 luxes). Antes de introducirse al garrafón, el aire se hace pasar a través de filtros de vidrio empacados

con fibra de vidrio. Todo el sistema se manejó de manera estéril. La aereación impidió la sedimentación de las células de algas y su depósito en la paredes del garrafón, exponiéndolas al mismo tiempo a períodos iguales de luz.

Sistema de cultivo. - utilizó el sistema de cultivo semi-continuo (Cáceres *et al.*, 1980), con una dilución del 50%. El reemplazo de medio de cultivo se hizo con la ayuda de una bomba peristáltica.

Recuperación y secado de la biomasa celular. - La biomasa se separó por centrifugación, en una centrífuga semicontinua Westfalia a 10,000 rpm. con una velocidad de flujo de alimentación de 1 litro por minuto. La torta resultante de la primera centrifugación se lavó 3 veces consecutivas, con una solución de formiato de amonio al 1% p/v para eliminar las sales, centrifugándose cada vez en las mismas condiciones. Posteriormente, se congeló y liofilizó en una liofilizadora de piso New Brunswick Scientific Co., Inc. modelo V-13, el polvo obtenido se almacenó en viales con tapón de baquelita colocándose en un desecador a temperatura ambiente.

Determinaciones Analíticas. - A la biomasa se le efectuaron los siguientes análisis por triplicado. Contenido de cenizas (Aldana, 1986), proteína verdadera por el método de Dorsey *et al.* (1978) utilizando el reactivo de Folin. Para la determinación de lípidos, ■ hizo una extracción según la técnica de Davis *et al.* (1969), previa hidrólisis de la muestra con 3 ml de HCl 6N en ampollitas selladas al vacío. La muestra hidrolizada se trató con 3 ml de hexano para extraer los lípidos, repitiendo la extracción 3 veces. Se obtuvieron dos fracciones, la fase orgánica se colocó en vasos de precipitado previamente puestos a peso constante y se evaporó, por último se pesaron. La fase acuosa se utilizó para la determinación de azúcares por cromatografía de gases.

Los carbohidratos totales se determinaron por el método de Dubois *et al.* (1956). Para el análisis de la fracción de azúcares se utilizó la fase acuosa obtenida durante la extracción de lípidos, la que pasó por una columna de intercambio iónico en fase OH⁻ eluyendo con 15 ml de metanol. La fracción eluida se evaporó a sequedad en un evaporador al vacío. En esta fracción se analizaron los azúcares por cromatografía de gases, manteniéndose las siguientes condiciones: nitrógeno, flujo 30 ml min⁻¹ columna OV-17 al 3% supelcoport 80/100 mesh 1.80 m 2 mm DI, las temperaturas de operación fueron de 350 °C para el detector de 300 °C para el inyector y para la columna fue de 140 °C manteniéndose así por cuatro minutos. Los carbohidratos deshidratados se pasaron con metanol a un frasco de reacción, lavando varias veces el recipiente que los contenía para evitar pérdidas de material y se evaporó a sequedad en corriente de nitrógeno (N₂). A partir de esta fracción se formaron los derivados trimetilsilil que fueron analizados siguiendo el método de Sweeley *et al.* (1963), con ligeras variantes. A la fracción deshidratada se le adicionaron: piridina, hexametildisilazano y trimetil clorosilano (1:6:3) grado analítico (Merck). Los frascos de reacción ■ protegieron de la humedad y se colocaron en baño de agua a 65 °C durante 40 min. Las muestras así preparadas se inyectaron en el cromatógrafo de gases aplicando las condiciones antes mencionadas.

La composición de ácidos grasos, ■ determinó extrayendo la fracción de lípidos de acuerdo al método de Bligh & Dyer (1959) modificado por Mayzaud & Martin (1957). La cuantificación de ácidos grasos se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5710 con detector de ionización de flama bajo las siguientes condiciones: columna FFAP 15% supelcoport 80/100 mesh, las temperaturas de operación fueron de 300 °C para el detector, de 250 °C para el inyector y para la columna fue de 180 °C, manteniéndose así por ocho minutos y con aumento gradual de

2 °C por minuto, hasta alcanzar los 240 °C, temperatura que se sostuvo durante 16 min. La fracción de lípidos se trató previamente según el método de Metcalf (1969) para obtener los metil ésteres. El residuo de cloroformo se evaporó a sequedad, se adicionaron 20 ml de etanol-éter (3:1 v/v) y 0.5 ml, de KOH 10 N, se llevó a ebullición durante 2 h cubriendo con vidrio de reloj y controlando que el contenido de etanol permaneciera constante. Se dejó enfriar, adicionándose 20 ml de agua destilada y 30 ml de éter. Después de agitar y sedimentar, se formaron dos fases: la fase acuosa se trató con 3 ml de HCl 1.5 N, adicionándose 30 ml de éter y las fracciones estéreas fueron evaporadas a sequedad. El residuo fue tratado con 1 ml de solución de trifloruro de boro-metanol al 14%, colocándose en agua hirviendo por 20 minutos, una vez frío se extrajo con 3 ml éter y se lavó dos veces más con 2 ml de éter, dejándose evaporar hasta un volumen de 1 ml. Una alícuota de esta solución fue inyectada en el cromatógrafo de gases.

Para la análisis de aminoácidos, se utilizó un analizador Beckman 118 CL. Se hidrolizaron 2 mg de muestra en 1 ml de HCl mercaptoctanol 6 N, en ampollitas selladas al vacío durante 20 h. La muestra hidrolizada se redisolvió en una solución buffer pH 3.5, previa evaporación del ácido y se filtró utilizando una membrana Millipore de 0.45 micrómetros de diámetros de poro. De este filtrado se tomaron 100 microlitros y se inyectaron al analizador de aminoácidos.

RESULTADOS Y DISCUSION

En Tabla II se observa que el contenido de cenizas de *Isochrysis* sp. fue similar en ambos medios de cultivo. Estos datos concuerdan con los reportados por Whyte (1987) para *I. galbana* (10.78%) crecida en medio f/2-Guillard. Para *T. chui* en los medios de Miquel-Matue y f/2-Guillard el contenido de cenizas fue elevado (20 y 22% respectivamente). Whyte (1987), informó sobre valores similares para *T. chui*. Parsons *et al.* (1961) trabajando con *T. maculata* encontraron un alto porcentaje de cenizas y lo atribuyeron a los cloruros.

Con relación al contenido de proteínas su concentración fue mayor para *Isochrysis* en el medio f/2-Guillard (24% base seca) que en Miquel-Matue (19% base seca). Fábregas *et al.* (1985), determinaron para *I. galbana* 209 g de proteínas ml⁻¹ cuando se desarrolló a una concentración de 4 mM de NaNO₃ y 30‰ de salinidad, en el presente trabajo encontramos para *Isochrysis* sp. 182 g de proteínas ml⁻¹ en el medio Miquel-Matue con la misma concentración de nitratos (KNO₃) y a una salinidad de 32‰. Por el contrario para una concentración de nitratos menor (como la del f/2-Guillard), el contenido de proteínas fue mayor (325 g ml⁻¹).

TABLA II
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS BIOMASAS DE MICROALGAS

Microalga	Medio de cultivo	% EN BASE SECA			
		Proteína	Lípidos	Carboh.	Cenizas
<i>Isochrysis</i> sp.	Miquel-Matue	18	12	54	12
<i>Isochrysis</i> sp.	f/2-Guillard	24	32	20	15
<i>T. chui</i>	Miquel-Matue	19	22	36	20
<i>T. chui</i>	f/2-Guillard	19	25	36	22

Para *T. chui* el valor de proteínas se mantuvo constante (19% base seca) en ambos medios. Esta cantidad es superior a la reportada por Wikfors *et al.* (1984) para *T. maculata* (15.6%) y *Dunaliella salina* (17.2%) en un medio conteniendo 77.5 mg l⁻¹ de NaNO₃ y 5 ml de KH₂PO₄. Probablemente lo que aquí influyó fue la concentración de los oligoelementos, que en la formulación de Miquel-Matue es menor que la de f/2-Guillard. Cuando Wikfors *et al.* (1984) cultivaron a *T. maculata* y *D. salina* en concentraciones superiores a 300 mg l⁻¹ de NaNO₃ y 20 mg l⁻¹ de KH₂PO₄ manteniendo la misma concentración de oligoelementos que la presente en f/2-Guillard, obtuvieron 31 y 39% proteínas respectivamente. Por otra parte, la formulación de Miquel-Matue resultó más adecuada para la obtención de una mayor densidad celular de *Isochrysis sp.* pero no para la cantidad de proteínas; mismas que fue superior en f/2-Guillard.

TABLA III
PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE LA BIOMASAS DE MICROALGAS
(g de aminoácido por 100 g de proteína)

	<i>Isochrysis sp.</i> Miquel-Matue	<i>Isochrysis sp.</i> f/2-Guillard	<i>T. chui</i> Miquel-Matue	<i>T. chui</i> f/2-Guillard
Lis	2.24	5.20	5.25	4.68
His	2.24	2.28	2.19	1.78
Arg	6.09	4.71	5.41	4.94
Asp	9.18	4.71	10.03	9.26
Tre	3.93	4.64	5.56	5.15
Ser	4.59	4.99	5.64	5.42
Glu	11.34	10.05	12.54	11.05
Pro	5.90	4.36	4.94	5.0
Gli	6.46	6.24	7.29	6.84
Ala	9.84	6.74	10.19	8.94
Cis	-	-	-	-
Val	5.99	5.06	6.11	5.10
Met	0.56	0.62	-	0.42
Ile	4.12	3.60	3.52	3.94
Leu	9.18	9.15	9.41	9.94
Tir	6.09	3.5	2.50	3.05
Fen	5.62	5.13	5.25	5.94
Amonia	6.56	13.10	4.0	9.0

- : No se detectó.

Lis: Lisina, His: Histidina, Arg: Arginina, Asp: Aspártico, Tre: Treonina, Ser: Serina, Glu: Glutámico, Pro: Prolina, Gli: Glicina, Ala: Alanina, Cis: Cistina, Val: Valina, Met: Metionina, Ile: Isoleucina, Leu: Leucina, Tir: Tirosina, Fen: Fenilalanina.

En general, los valores obtenidos son bajos comparados con los reportados por Parsons *et al.* (1961) y Fábregas & Herrero (1985) entre otros; sin embargo para los fines de alimentación larvaria se pueden considerar aceptables (Andrews *et al.*, 1972).

En la Tabla III se observa que la proteína de las dos microalgas estuvo caracterizada principalmente por ácido glutámico, aspártico, alanina y leucina. Estos resultados están de acuerdo con los reportes de Parsons *et al.* (1961). Para los aminoácidos restantes su concentración fue menor (en un rango de 3-6 g aa para 100g de proteínas). Se detectaron trazas de histidina y aminoácidos azufrados en las

biomasas analizadas. No hubo resolución para cisteína en ninguna de las muestras. Por lo que se refiere a metionina, no hubo resolución en la muestra de *T. chui* crecida en el medio de Miquel-Matue. La concentración de los aminoácidos azufrados fue inferior al patrón de referencia de la FAO (1973) lo que es común para otros microorganismos (bacterias, levaduras, mohos y otros tipos de algas) (Fisher & Little, 1953; De la Fuente *et al.*, 1977). El perfil de otros aminoácidos (tre, lis, val, ile, leu y fen) compara favorablemente con el patrón de referencia de la FAO (1973). Chau *et al.* (1967) informaron que en las microalgas estudiadas por ellos (entre las que se encuentra *Monochrysis lutheri*), los aminoácidos predominantes fueron leucina (10.2%), alanina (9.7%) y los ácidos glutámico y aspártico, en concentraciones que resultaron similares a las reportadas en el presente trabajo para *Isochrysis* sp. crecida en el medio Miquel-Matue (leu 9%, ala 9.8%). Los valores para los ácidos aspártico y glutámico fueron ligeramente superiores a los determinados, por Chau *et al.* (1967).

T. chui prácticamente no presentó diferencias en su composición de aminoácidos al crecer en ambos medios de cultivo, siendo similar a la de *Isochrysis* sp. En la literatura se reportan para *T. suecica* (Fabregas & Herrero, 1985a, 1985b) concentraciones de leucina de 9.26% y valina 5.6%. En este trabajo, los valores fueron 5 y 6% desarrolladas en f/2-Guillard y Miquel-Matue respectivamente. De manera general, en la literatura se informa de bajos niveles de cisteína y metionina para todas las especies de microalgas, así como de abundancia en alanina, ácidos aspártico y glutámico y de leucina (Fabregas & Herrero, 1985; De la Fuente *et al.*, 1977). Es importante hacer notar que en las biomasas de *Isochrysis* sp. y *T. chui* aquí estudiadas, se identificaron los once aminoácidos clasificados como esenciales para *Mytilus californianus* (Harrison, 1975).

El contenido de lípidos totales varió entre 10 y 32% (base seca) para las dos microalgas. Para *Isochrysis* sp. crecida en Miquel-Matue el contenido de lípidos fue de 12%. Este valor es inferior al encontrado por autores como Whyte (1987), quien determinó 19 % para *I. galbana*, Enright (1986) determinó 17% para la misma especie y Parsons *et al.* (1961) reportaron 11.6% para *Monochrysis lutheri*.

Cuando *Isochrysis* sp. se cultivó en el medio f/2-Guillard, la concentración de lípidos aumentó comparada con la obtenida en el medio Miquel-Matue y con relación a otras especies de fitoplancton. Esto no debe resultar extraño, ya que las microalgas están consideradas como una fuente alternativa de aceites naturales y de grasas (Zuñiga, 1983; Dubinsky *et al.*, 1978; Berner, 1982). Por otra parte, se sabe que el contenido de lípidos así como cualquier otro constituyente celular, puede variar de acuerdo a las condiciones de cultivo y que específicamente la concentración de nitrógeno en el medio así como la temperatura, influyen directamente sobre las proporciones intracelulares de lípidos. Medios de cultivo deficientes en nitrógeno estimulan la acumulación de lípidos. En el medio f/2-Guillard, la fuente de nitrógeno en forma de nitratos (NaNO_3) es menor (100 mg l^{-1}) que la presente en el medio Miquel-Matue (400 mg l^{-1}), lo que pudiera explicar el incremento en el contenido de lípidos o bien que este valor fuera característico de la especie.

Por el contrario *T. chui* en ambos medios de cultivo mantuvo su contenido de lípidos prácticamente sin cambio, 25% en f/2-Guillard y 22% en Miquel-Matue, valores que concuerdan con lo señalado por Wikfors (1986) para *T. maculata* (20%). El porcentaje de lípidos totales fue elevado para las dos especies.

En general para las dos microalgas la concentración de ácidos grasos fue mayor cuando crecieron en el medio de Miquel-Matue (Figuras 1 y 2). Es evidente que los

ácidos de 16 y 18 carbonos predominaron, siendo los principales el palmítico y el oleico. La concentración de ácido oleico, para *Isochrysis* sp. en medio Miquel-Matue fue 39% y en f/2-Guillard 30%. Para *T. chui* fue 25% en el medio de Miquel-Matue y 12% en f/2-Guillard. Yamayuchi (1987) determinó una concentración elevada de ácido oleico (57%) en el alga verde *Botriococcus braunii*. En *T. chui* el contenido de ácido

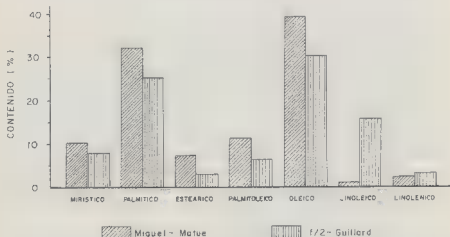


Figura 1. - Ácidos grasos en la fracción de lípidos de *Isochrysis* sp.

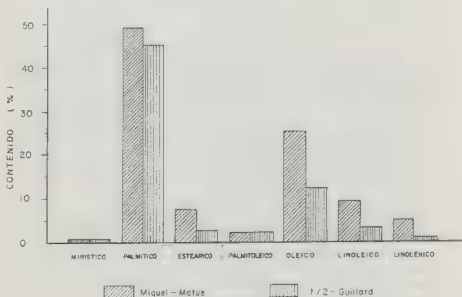


Figura 2. - Ácidos grasos en la fracción de lípidos de *Tetraselmis chui*.

palmitico fue superior al del oleico en ambos medios, al contrario de *Isochrysis* sp. En f/2-Guillard el contenido de ácido linoleico para *Isochrysis* sp. fue de 15.52%, mientras que en el medio de Miquel-Matue fue de 1.02%. Esto concuerda con lo que Enright *et al.* (1986) encontraron para el alga *I. aff. galbana* clona T-iso, donde los principales ácidos grasos saturados fueron los de 14:0 y 16:0 carbonos y los insaturados de 18:1 y 18:2 carbonos.

En la biomasa de *T. chui* la concentración de ácido linoleico fue de 9.23% cuando creció en Miquel-Matue y 3% en f/2-Guillard. Es importante destacar que las dos microalgas tuvieron una cantidad elevada de ácido linoleico (9.23% para *T. chui* y 15.52% para *Isochrysis* sp.) y de ácido linolénico (4.5% y 2.93% respectivamente). Este último es un ácido graso esencial específicamente para peces y crustáceos (Kanazawa *et al.*, 1978; Shewbart *et al.*, 1973, citado por New, 1976). El hecho de que en general exista mayor concentración de ácidos grasos en las biomásas obtenidas en el medio de Miquel-Matue, con respecto al f/2-Guillard, puede atribuirse a que la concentración de nitratos (KNO_3) es más elevada en el primer medio de cultivo y según observaciones hechas por De Paschke & Wheeler (1954), Mangul & Shlenk (1957) y Schlen *et al.* (1960), citados por Pugh (1971), un nivel elevado de nitrógeno en el medio de cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* está asociado con altas concentraciones de ácidos grasos de 16 y 18 carbonos. Chuecas & Riley (1969) puntualizaron que los efectos del estado nutritivo del medio de cultivo sobre la composición de ácidos grasos de la célula, varía de un clase de alga a otra.

La concentración de carbohidratos totales fue mayor en *Isochrysis* sp. cultivada en el medio Miquel-Matue (54%) que la obtenida en el medio f/2-Guillard (20%). Esto podría sugerir que esta microalga es más sensible a cambios en la composición del medio de cultivo, ya que en igualdad de condiciones *T. chui*, tuvo la misma concentración de carbohidratos totales en ambos medios. Autores como Mayzaud & Martin (1957), y Marshal & Or (1962), determinaron valores superiores a 50% en peso seco como carbohidratos para fitoplancton natural. En fitoplancton cultivado, la proporción relativa de carbohidratos a otros componentes orgánicos varía a través del ciclo de vida, aunado a las condiciones de cultivo (Walne, 1974). Por su parte Pillsbury (1975) determinó para *Dunaliella tertiolecta* (Butch) clona, un contenido de carbohidratos de 34% y para *Prorocentrum minimum* (Parvillard) Schuller clona EXUV uno de 43%. El mismo autor reportó para *I. aff. galbana* clona T-iso 18% de carbohidratos, similar a lo reportado para *I. galbana* clona Iso (21%) por Enright *et al.* (1986). Estos datos están cercanos a los obtenidos en el presente trabajo en el medio f/2-Guillard (20%). Es probable que el alto contenido de carbohidratos encontrado para *T. chui*, se deba a la naturaleza de su envoltura celular, que está compuesta por un glucano celulósico (Dodge, 1973). Wikfors (1986) reportó para *T. maculata* un contenido de carbohidratos de 37.8% base seca, en un medio con 77.5% mg l^{-1} de NaNO_3 y 5 mg l^{-1} de KH_2PO_4 , relación que es similar a la del medio f/2-Guillard aquí utilizado, no así para el medio de Miquel-Matue, que teniendo una concentración mayor de KNO_3 y Na_2HPO_4 estimuló el mismo nivel de producción de carbohidratos.

Con respecto al perfil de carbohidratos, los azúcares predominantes fueron la ramnosa y xilosa para ambas algas crecidas tanto en el medio f/2-Guillard como en Miquel-Matue. Algunos autores han reportado la presencia de ramnosa y xilosa, en diatomeas y algas verdes (Handa & Yanagi, 1969; Parsons *et al.*, 1961). Whyte (1987) encontró estos dos azúcares en *I. galbana*, *Isochrysis* sp. clona T-Iso, *T. suecica* y en

algunas diatomeas. Chu *et al.* (1982) determinó ramnosa en la biomasa de *P. lutheri*. En la literatura se reporta que el perfil de azúcares varía ampliamente entre las microalgas.

CONCLUSIONES

Los medios de cultivo ensayados, tuvieron efecto sobre la composición química de la biomasa de *Isochrysis* sp., no así sobre la de *Tetraselmis chui*, que no presentó cambios en ninguna de las condiciones estudiadas, encontrándose como su principal componente a los carbohidratos. Los medios de cultivo utilizados en los experimentos, no son adecuados para la obtención de biomásas con alto contenido de proteínas, de ninguna de las dos microalgas estudiadas. El efecto de la composición del medio de cultivo, sobre los perfiles de aminoácidos y de ácidos grasos de las algas estudiadas, fue más evidente en *Isochrysis* sp. que en *Tetraselmis chui*. El medio de cultivo f/2-Guillard estimuló la síntesis de lípidos en *Isochrysis* sp. mientras que el de Miquel-Matue, la de carbohidratos en la misma alga. El análisis químico de las biomásas de *Isochrysis* sp. y *T. chui*, crecidas en cualquiera de los dos medios de cultivo y bajo las condiciones del presente estudio, indica que es posible su utilización para alimentar juveniles de bivalvos y otras especies.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALDANA A.D., 1986 - *Croissance et composition chimique élémentaire de larves de Mytilus edulis en relation avec la nourriture fournie: algues monocellulaires et bactéries*. Doctorat de 3ème cycle. Université de Bretagne occidentale.
- ALFONSO E. & LEAL S., 1981 - Influencia de diferentes factores en el volumen celular de algas planctónicas en cultivo. *Rev. Invest. Mar. Univ. La Habana, Cuba* 2: 43-45.
- ANDREWS J.W., SICK L.V. & BAPTIST G.J., 1972 - The influence of dietary protein and energy levels on growth and survival of penaeid shrimp. *Aquaculture* 50: 341-347.
- BERNER T.A., DUBINSKY A. & AARONSON S., 1982 - The potential lipid content of microalgae and its use as potential lipid source for industry. In A. SAN PIETRO (Ed.), *Biosaline Research: A look to the Future*. Indiana Univ. Bloomington, Plenum Press N. York 23: 439.
- BLIGH E.G. & DYER W.J., 1959 - A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad. J. Biochem. and Physiol.* 37: 911-917.
- BOLD H.C., 1942 - The cultivation of algae. *The botanical review*. Vol. VIII, No 2, pp. 90-96.
- CÁCERES M.C., PAREDES G. & LEYVA G., 1980 - Aparato de cultivo semicontinuo de algas unicelulares para su uso en la acuicultura. *Unidad de Ciencias Marinas. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Ensenada, B.C.*
- CHAU Y.K., CHUECAS L. & RILEY J.P., 1967 - The component combined aminoacids of some marine phytoplankton species. *J. Mar. Biol. Ass. UK* 47: 543-544.
- CHU F.E., DUPUY J. & WEBB K.L., 1982 - Polysaccharide composition of five algal Species used as food for larvae of the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 29: 241-252.
- CHUECAS L. & RILEY J.P., 1969 - Component fatty acids of the total lipids of some marine phytoplankton. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 49: 97-116.
- DAVIS Ch., FREEDMAN E.S.D., DOUGLAS H. & BRAUDE A.I., 1969 - Analysis of sugar in bacterial endotoxins by Gas-Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* 28: 243-256.
- DE LA FUENTE G.A., FLORES M.R., MOLINA R., ADMENGOR L. & BRESSANI R., 1977 - Some nutritional characteristics of a naturally occurring alga (*Microcystis* sp.) in Guatemalan Lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 6-9.

- DE PAUW N., 1981 - Use and production of microalgae as food for nursery bivalves citado, en C. CLAUS, N. DE PAUW & E. JASPERS (Eds.). *Eur. Maric. Soc. Spec. Publ.* 7 Belgium: 35-59.
- DODGE J.D., 1973 - *The fine structure of algae cell*. Academic Press, London-New York, xii + 261 p.
- DORSEY E.T., Mc DONALD P. & ROELS O.A., 1978 - Measurements of phytoplankton protein content with the heated biuret-folin assay. *J. Phycol.* 14 (2): 167-171.
- DUBINSKY Z., BERNER T. & AARONSON S., 1978 - Potential of large scale algal culture for biomass and lipid production in arid lands. *Biotech. Bioeng. Symp.* 8: 51-68.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBER P.A. & SMITH F., 1956 - Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- ENRIGHT C.T., NEW KIRK G.F., CRAIGE J.S. & CASTELL S.D., 1986 - Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 96: 1-13.
- EPIFANIO C.E., 1979a - Comparison of yeast and algal diets for bivalve molluscs. *Aquaculture* 16: 187-192.
- EPIFANIO C.E., 1979b - Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae in diets fed the american oyster *Crassostrea virginica* and the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture* 18: 1-12.
- FÁBREGAS J., ABALDE J., HERRERO C., CABEZAS B. & VEIGA M., 1984 - Growth of marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* 42: 207-215.
- FÁBREGAS J., HERRERO C., ABALDE J. & CABEZAS B., 1985 - Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in batch culture with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture* 50: 1-11.
- FÁBREGAS J. & HERRERO C., 1985 - Marine microalgae as a potential source of single cell protein (SCP). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 110-113.
- FISHER A.W. & LITTLE A.D., 1953 - Microscopic algae as industrial raw material. In: J.S. Burlew (Ed), *Algal culture from laboratory to pilot plant*. Carnegie Institution of Washington, Washington D.C. Ch. 21: 311-315.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. (FAO/WHO) 1973 - Energy and protein requirements. WHO Techn. Rep. Ser. No. 522. Geneve, Switzerland.
- FLAAK A.R. & EPIFANIO C.E., 1978 - Dietary protein level and growth of the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 45: 157-163.
- GUILLARD R. & RYTHER J.H., 1962 - Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran ("F" medium). *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- HANDA N. & YANAGI K., 1969 - Studies on the water extractable carbohydrates of the particulate matter from the northwest Pacific Ocean. *Mar. Biol.* 4: 197-207.
- HARRISON C., 1975 - The essential aminoacids of *Mytilus californianus*. *Veliger*. 18: 189-193.
- HOTSMAN V., 1985 - The uses of microalgae in aquaculture. *Arch. Hydrobiol. Beh. Erggn. Limnol.* 20: 153-156.
- KAIN J.M. & FOGG G.E., 1958 - Studies on the growth of the marine phytoplankton II. *Isochrysis galbana*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 37: 781-788.
- KANAZAWA A., TESHIMA S., ENDO M. & KAYAMA M., 1979 - Effects of eicosapentaenoic acid on growth and fatty acid composition of the prawn, *Penaeus japonicus*. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 27: 35-40.
- LAING I. & UTTING S.D., 1980 - The influence of salinity on the production of two commercially important unicellular algae. *Aquaculture* 21: 79-86.
- LAING I. & HELM M.M., 1981 - Factors affecting the semicontinuous production of *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* 42: 207-215.
- LOOSANOF V.L. & DAVIS H.C., 1963 - Rearing of bivalve molluscs. *Adv. in Mar. Biol.* 1: 1-36.

- MARSHAL S.M. & OR A.B., 1962 - Carbohydrate as a measure of phytoplankton. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 42: 511-519.
- MAYZAUD P. & MARTIN J.L., 1957 - Some aspects of the biochemical and mineral composition of marine plankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 17: 297-310.
- METCALF L.D., 1969 - Determination of fatty acids by GLC. *Nature* 188: 142-143.
- MYKLESTAD S., 1974 - Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 15: 261-274.
- NEW M.B., 1976 - A review of dietary studies with shrimp and prawns. *Aquaculture* 9: 101-144.
- PARSONS T.R., STEPHENS K. & STRICKLAND J.D.H., 1961 - On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish Res. Bd. Canada* 18: 1001-1016.
- PILLSBURY K.S., 1975 - The relative food value and biochemical composition of five phytoplankton diets for queen conch, *Strombus gigas* (Line) larvae.
- PUGH P.R., 1971 - Changes in the fatty acid composition of *Coscinodiscus eccentricus* with culture age and salinity. *Mar. Biol.* 11: 118-124.
- RICHMOND A., 1980 - Phototrophic Microalgae. *Biotechnology*. 3: 111-143.
- SAKSHAUG E., 1980 - *The physiological ecology of phytoplankton. 2: Problems in the methodology of studying phytoplankton.* I. Morris Editor Univ. of Calif. Press. pp. 57-91.
- SPOEHR H.A. & MILNER H.W., 1949 - The chemical composition of *Chlorella*: effects of environmental conditions. *Plant Physiol.* 24: 120-149.
- SWEETLEY C.C., BENTLEY R., MAKITA M. & WELS W.W., 1963 - Gas liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugar and related substances. *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2497-2507.
- UKELES R., 1961 - The effect of temperature on the growth and survival of several marine algal species. *Biol. Bull.* 120: 255-264.
- WALNE P.R., 1970 - Studies of the food value of nineteen genera of alga to juvenile bivalves of genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish. Invest. Lond.*, Ser. 2: 62.
- WALNE P.R., 1974 - *Culture of Bivalve molluscs. 50 years experience at Conway.* Fishing News Books Ltd. Surrey. 173 p.
- WHYTE J.N.C., 1987 - Biochemical composition and energy of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60: 231-241.
- WIKFORS G.H., 1986 - Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture* 59: 1-14.
- YAMAYUCHI K., NAKANO H., MURAKAMI M., OSAMU S., MIDORIKANDA N., NAKAMURA A. & IWANOTO H., 1987 - Lipid composition of green algae *Bostryococcus braunii*. *Agric. Biol. Chem.* 51: 493-498.
- ZUÑIGA H.M.E., LEYVA M.A. & MARKOVITZ A.S., 1983 - Las microalgas: Fuentes potenciales de aceites y grasas. *Rev. Alimentos* 8: 43-47.